

MH

PATENT COOPERATION TREATY

EO/US
PCT/JP99/04533

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

| | |
|---|--|
| Date of mailing: 02 March 2000 (02.03.00) | |
| International application No.: PCT/JP99/04533 | Applicant's or agent's file reference: G873-PCT |
| International filing date: 23 August 1999 (23.08.99) | Priority date: 24 August 1998 (24.08.98) |
| Applicant: FUNAKOSHI, Akihiro et al | |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
22 September 1999 (22.09.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

| | |
|---|---|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|---|---|

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT
国際調査報告(法 8 条、法施行規則第 40、41 条)
[PCT 18 条、PCT 規則 43、44]

| | | |
|---------------------------------------|---|--------------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 G 8 7 3 - P C T | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式 (P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記 5 を参照すること。 | |
| 国際出願番号 P C T / J P 9 9 / 0 4 5 3 3 | 国際出願日 (日.月.年) 2 3 . 0 8 . 9 9 | 優先日 (日.月.年) 2 4 . 0 8 . 9 8 |
| 出願人 (氏名又は名称) 中外製薬株式会社 | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第 41 条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第 47 条 (P C T 規則 38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 14-26 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲14~26は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第17条(2)(a)(i) 及びPCT規則39.1(iV) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ A61K45/00、A61K39/395

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ A61K45/00、A61K39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)、REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|----------------------|
| X Y | Chemical Abstracts, Vol. 121, Abstract 番号 154705 (1994), "Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet-specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice" | 1, 27 2-13, 28-39 |
| X Y | H. Hank Simms et al., "Polymorphonuclear Leukocyte Dysregulation During the Systemic Inflammatory Response Syndrome", Blood, | 1, 27 2-13, 28-39 |

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 11. 99

国際調査報告の発送日

30.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C (続き) . 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|---------------------------------------|
| | Vol. 83, No. 5 (1994) P. 1398-1407 | |
| Y | EP, 572118, A1 (TOSOH CORP.) 1. 12 月. 1993 (01. 12. 93) & JP, 5-30498 6, A & US, 5866689, A & DE, 693196 62, E & IL, 105541, A | 1-4, 6, 10-13 27-30, 32, 36- 39 |
| Y | WO, 92/19759, A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 12. 11月. 1992 (1 2. 11. 92) & EP, 628639, A1 & DE, 6 9229482, E & US, 5795965, A & JP, 5-227970, A | 1-13, 27-39 |
| Y | 高久 史磨 外「メルク マニュアル 第16版」(1995年5 月1日第3刷発行) P. 760-766、「肺炎」の項 | 12, 13, 38, 39 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|--|---|---|
| Applicant's or agent's file reference G873-PCT | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/JP99/04533 | International filing date (day/month/year) 23 August 1999 (23.08.99) | Priority date (day/month/year) 24 August 1998 (24.08.98) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 45/00, 39/395 | | |
| Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA | | |

| |
|--|
| <p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p> |
| <p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p> |

| | |
|--|---|
| Date of submission of the demand 22 September 1999 (22.09.99) | Date of completion of this report 05 April 2000 (05.04.2000) |
| Name and mailing address of the IPEA/JP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04533

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04533

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 14-26

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 14-26 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

The subject matter of claims 14-26 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international preliminary examination by this International Preliminary Examining Authority in accordance with PCT Article 34(4)(a)(i) and Rule 67.1(iv).

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 14-26

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04533

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|------------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 1-13,27-39 | YES |
| | Claims | | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | | YES |
| | Claims | 1-13,27-39 | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-13,27-39 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

Document 1: Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet-specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice, (Iain L. Campbell et al.), Am. J. Pathol., 1994, Vol. 145, No. 1, pages 157-166

Document 2: Polymorphonuclear Leukocyte Dysregulation during the Systemic Inflammatory Response Syndrome, (H. Hank Simms et al.), Blood, 1994, Vol. 83, No. 5, pages 1398-1407

Document 3: EP, 572118, A1 (Tosoh Corp.), 1 December, 1993 (01.12.93); & JP, 5-304986, A & US, 5866689, A & DE, 69319662, E & IL, 105541, A

Document 4: WO, 92/19759, A1 (Chugai Seiyaku K.K.), 12 November, 1992 (12.11.92); & EP, 628639, A1 & DE, 69229482, E & US, 5795965, A & JP, 5-227970, A

Document 5: The Merck Manual 16th Ed., (Fumimaro Takaku et al.), published 1 May 1995 (3rd printing), pages 760-766; see 'Pancreatitis' section

Concerning claims 1, 27

Document 1 discloses the fact that pancreatitis can be caused by excessive expression of interleukin-6. Document 2 [page 1401, right column, lines 19-22; Fig. 4] discloses the fact that anti-interleukin-6 weakens the PMN (polymorphonuclear leukocyte) oxidation reaction that is observed as a symptom inflammation of organs such as pancreas. It is thus considered that documents 1 and 2 effectively disclose the fact that inflammation of the pancreas can be suppressed by inhibiting interleukin-6, and so it is considered that, based on the disclosures in these documents, the idea of using an interleukin-6 antagonist in the treatment of pancreatitis would be obvious to a person skilled in the art.

Concerning claims 2-11, 28-37

Documents 3 and 4 disclose various antibodies as interleukin-6 antagonists. It is considered that, based on the disclosures in either document 1 or document 2, using these antibodies in the treatment of pancreatitis would be obvious to a person skilled in the art, and thus that the subject matter of claims 2-11 and 28-37 does not involve an inventive step.

Concerning claims 12, 13, 38, 39

Document 5 discloses the fact that dropsy is a typical symptom of pancreatitis. It is considered that, based on the disclosures in either document 1 or document 2, it would be obvious to a person skilled in the art that if the inflammation in pancreatitis were suppressed by administering an interleukin-6 antagonist then the associated dropsy would also be cured; it is thus considered that the subject matter of claims 12, 13, 38 and 39 does not involve an inventive step.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 25 APR 2000

PCT

| | | |
|--|--|--------------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 G 8 7 3 - P C T | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ I P E A / 4 1 6）を参照すること。 | |
| 国際出願番号 P C T / J P 9 9 / 0 4 5 3 3 | 国際出願日 (日.月.年) 2 3 . 0 8 . 9 9 | 優先日 (日.月.年) 2 4 . 0 8 . 9 8 |
| 国際特許分類 (IPC) I n t . C l ⁷ A 6 1 K 4 5 / 0 0 , A 6 1 K 3 9 / 3 9 5 | | |
| 出願人 (氏名又は名称) 中外製薬株式会社 | | |

| |
|---|
| 1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。 |
| 2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>5</u> ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。 |
| 3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input checked="" type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見 |

| | | |
|--|--|-------------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日 2 2 . 0 9 . 9 9 | 国際予備審査報告を作成した日 0 5 . 0 4 . 0 0 | |
| 名称及びあて先 日本国特許庁 (I P E A / J P) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 田村 聖子 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2 | 4 C 9 0 5 1 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | | | |
|--------------------------|------------|---|-------|--------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> | 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| | 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 明細書 | 第 | _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| | 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | PCT 19条の規定に基づき補正されたもの |
| | 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 請求の範囲 | 第 | _____ | 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| | 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 図面 | 第 | _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| | 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| | 明細書の配列表の部分 | 第 | _____ | ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ⅲ. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 14～26

理由：

- ☒ この国際出願又は請求の範囲 14～26 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲 14～26 は、治療による人体の体の処置方法に関するものであって、PCT第34条(4)(a)(i)及びPCT規則67.1(iV)の規定により、この国際予備審査機関が国際予備審査を行うことを要しない対象に係るものである。

- ☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

- ☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

- ☒ 請求の範囲 14～26 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-13, 27-39 有
請求の範囲 無

進歩性(1S)

請求の範囲 有
請求の範囲 1-13, 27-39 無

産業上の利用可能性(1A)

請求の範囲 有
請求の範囲 1-13, 27-39 無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1 Iain L. Campbell et al, "Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet-specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice", Am. J. Pathol., Vol. 145, No. 1 (1994), P. 157-166

文献2 H. Hank Simms et al, "Polymorphonuclear Leukocyte Dysregulation During the Systemic Inflammatory Response Syndrome", Blood, Vol. 83, No. 5 (1994) P. 1398-1407

文献3 EP, 572118, A1 (TOSOH CORP.) 1. 12月. 1993 (01. 12. 93) & JP, 5-304986, A & US, 5866689, A & DE, 69319662, E & IL, 105541, A

文献4 WO, 92/19759, A1 (CHUGAI SEIYAKU KABU SHIKI KAISHA) 12. 11月. 1992 (12. 11. 92) & EP, 628639, A1 & DE, 69229482, E & US, 5795965, A & JP, 5-227970, A

文献5 高久 史麿 外「メルク マニュアル 第16版」(1995年5月1日第3刷発行) P. 760-766、「膵炎」の項

請求の範囲1及び27について

文献1には、インターロイキン-6の過剰発現によって膵炎が引き起こされることが記載されており、かつ、文献2のP. 1401の右欄第19~22行目及びFig. 4には、抗インターロイキン-6が膵臓等の臓器炎症症状において見られるPMN (polymorphonuclear leukocyte) 酸化の反応を減弱させることが記載されている。これらはインターロイキン-6を抑制することにより膵臓の炎症を抑えることを記載しているものと認められるので、これらの文献の記載に基づいてインターロイキン-6のアнтаゴニストを膵炎治療のために適用することは当業者に容易であり、自明なことと認める。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V 欄の続き

請求の範囲 2-11 及び 28-37 について

文献 3 又は文献 4 には、インターロイキン-6 アンタゴニストとして種々の抗体が記載されているから、文献 1 又は文献 2 の記載に基づいて、これらの抗体を脾炎の治療に用いることは当業者に自明であり、進歩性を有さない。

請求の範囲 12, 13, 38, 39 について

文献 5 には、浮腫が脾炎の代表的な症状であることが記載されているから、文献 1 又は文献 2 の記載に基づいてインターロイキン-6 のアンタゴニストを投与して脾炎の炎症を抑制すれば、その浮腫も治癒されることは当業者に自明であり、進歩性を有さない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



| | | |
|---|-----------|---|
| (51) 国際特許分類6 A61K 45/00, 39/395 | A1 | (11) 国際公開番号 WO00/10607 (43) 国際公開日 2000年3月2日(02.03.00) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP99/04533 (22) 国際出願日 1999年8月23日(23.08.99) (30) 優先権データ 特願平10/251796 1998年8月24日(24.08.98) JP 特願平11/54302 1999年3月2日(02.03.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 船越顕博(FUNAKOSHI, Akihiro)[JP/JP] 〒815-0042 福岡県福岡市南区若久6丁目28-33 Fukuoka, (JP) 宮坂京子(MIYASAKA, Kyoko)[JP/JP] 〒156-0042 東京都世田谷区羽根木2丁目5番13号 Tokyo, (JP) (74) 代理人 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP) | | (81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書 |
| (54) Title: PREVENTIVES OR REMEDIES FOR PANCREATITIS CONTAINING IL-6 ANTAGONISTS AS THE ACTIVE INGREDIENT (54) 発明の名称 IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤 (57) Abstract Preventives or remedies for pancreatitis which contain as the active ingredient interleukin-6 (IL-6) antagonists such as an antibody against IL-6 receptor. | | |

(57)要約

インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニスト、例えばIL-6受容体
に対する抗体、を含んで成る肺炎の予防又は治療剤。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|---------|----|-----------------------|----|------------|
| AE | アラブ首長国連邦 | DM | ドミニカ | KZ | カザフスタン | RU | ロシア |
| AL | アルバニア | EE | エストニア | LC | セントルシア | SD | スーダン |
| AM | アルメニア | ES | スペイン | LI | リヒテンシュタイン | SE | スウェーデン |
| AT | オーストリア | FI | フィンランド | LK | スリ・ランカ | SG | シンガポール |
| AU | オーストラリア | FR | フランス | LR | リベリア | SI | スロヴェニア |
| AZ | アゼルバイジャン | GA | ガボン | LS | レソト | SK | スロヴァキア |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB | 英国 | LT | リトアニア | SL | シエラ・レオネ |
| BB | バルバドス | GD | グレナダ | LV | ルクセンブルグ | SN | セネガル |
| BE | ベルギー | GE | グルジア | LA | ラトヴィア | SZ | スワジランド |
| BF | ブルキナ・ファソ | GH | ガーナ | MA | モロッコ | TD | チャード |
| BG | ブルガリア | GM | ガンビア | MC | モナコ | TG | トーゴ |
| BJ | ベナン | GN | ギニア | MD | モルドヴァ | TJ | タジキスタン |
| BR | ブラジル | GW | ギニア・ビサオ | MG | マダガスカル | TZ | タンザニア |
| BY | ベラルーシ | GR | ギリシャ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国 | TM | トルクメニスタン |
| CA | カナダ | HR | クロアチア | ML | マリ | TR | トルコ |
| CF | 中央アフリカ | HU | ハンガリー | MN | モンゴル | TT | トリニダード・トバゴ |
| CG | コンゴ | ID | インドネシア | MR | モーリタニア | UA | ウクライナ |
| CH | スイス | IE | アイルランド | MW | マラウイ | UG | ウガンダ |
| CI | コートジボアール | IL | イスラエル | MX | メキシコ | US | 米国 |
| CM | カメルーン | IN | インド | NE | ニジェール | UZ | ウズベキスタン |
| CN | 中国 | IT | イタリア | NL | オランダ | VN | ヴェトナム |
| CR | コスタ・リカ | JP | 日本 | NO | ノルウェー | YU | ユーゴスラビア |
| CU | キューバ | KE | ケニア | NZ | ニュージーランド | ZA | 南アフリカ共和国 |
| CY | キプロス | KG | キルギスタン | PL | ポーランド | ZW | ジンバブエ |
| CZ | チェッコ | KP | 北朝鮮 | PT | ポルトガル | | |
| DE | ドイツ | KR | 韓国 | RO | ルーマニア | | |
| DK | デンマーク | | | | | | |

明 細 書

IL-6 アンタゴニストを有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤

発明の分野

本発明はインターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤に関する。

背景技術

IL-6はB細胞刺激因子2 (BSF2)あるいはインターフェロン β 2とも呼称されたサイトカインである。IL-6は、Bリンパ球系細胞の活性化に関与する分化因子として発見され (Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76)、その後、種々の細胞の機能に影響を及ぼす多機能サイトカインであることが明らかになった (Akira, S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78)。IL-6は、Tリンパ球系細胞の成熟化を誘導することが報告されている (Lotz, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258)。

IL-6は、細胞上で二種の蛋白質を介してその生物学的活性を伝達する。一つは、IL-6が結合する分子量約80kDのリガンド結合性蛋白質のIL-6受容体である (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981, Yamasaki, K. et al., Science (1987) 241, 825-828)。IL-6受容体は、細胞膜を貫通して細胞膜上に発現する膜結合型の他に、主にその細胞外領域からなる可溶性IL-6受容体としても存在する。

もう一つは、非リガンド結合性のシグナル伝達に係わる分子量約130kDの膜蛋白質gp130である。IL-6とIL-6受容体はIL-6/IL-6受

容体複合体を形成し、次いでgp130 と結合することにより、IL-6の生物学的活性が細胞内に伝達される (Taga, T. et al., Cell (1989) 58, 573-581)。

IL-6アンタゴニストは、IL-6の生物学的活性の伝達を阻害する物質である。これまでに、IL-6に対する抗体 (抗IL-6抗体)、IL-6受容体に対する抗体 (抗IL-6受容体抗体)、gp130 に対する抗体 (抗gp130 抗体)、IL-6改変体、IL-6又はIL-6受容体部分ペプチド等が知られている。

抗IL-6受容体抗体に関しては、いくつかの報告がある (Novick, D. et al., Hybridoma (1991) 10, 137-146、Huang, Y. W. et al., Hybridoma (1993) 12, 621-630、国際特許出願公開番号WO 95-09873、フランス特許出願公開番号FR 2694767、米国特許番号US 5 21628)。その一つであるマウス抗体PM-1 (Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906) の相捕性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体へ移植することにより得られたヒト型化PM-1抗体が知られている (国際特許出願公開番号WO 92-19759)。

膵炎 (pancreatitis) は、膵酵素活性化により膵組織内において自己消化を生ずる炎症性疾患である。これまでに、急性膵炎患者と健常人の末梢血単核球のIL-6産生量を比較すると、急性膵炎患者で有意に高いことや、全身性の合併症を発症している急性膵炎について、合併症の認められない症例と比較すると、末梢血単核球からのIL-6産生が高値であることが報告されている (de Beaux A.C. et al., Brit. J. Surgery, 83, 1071-5, 1996)。また、血中IL-6値は、急性膵炎患者の重症例で、より高値を示すと共に、他のパラメーターに比較し早期に反応することから、膵炎の重症度を予測するための指標になると考えられてきた (Inagaki, T. et al., Pancreas

, 14, 1-8, 1997) 。

これまで急性膵炎では、IL-1及びTNF が病態と深く関係することが示唆されており、両サイトカインに対する受容体を欠くマウスでは重症化せず、死亡率も著しく減少することが報告されている (Denham, W. et al., Gastroenterology, 113, 1741-6, 1997)。さらに、それらの阻害剤を用いた膵炎の治療の試みが動物モデルを用いてなされている (Norman, J. et al., Surgery, 117, 648-655, 1995、Hughes, C.B. et al., American J. Surgery, 171, 274-280, 1996, Norman, J. et al., Surgery, 120, 515-521, 1996) 。

しかしながら、これまでに膵炎において抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストを用いIL-6の生物学的活性を特異的に抑制する試みはなされておらず、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストが膵炎に治療効果を示すことは知られていなかった。

発明の開示

本発明は、前記の欠点を有さない膵炎の予防又は治療剤を提供しようとするものである。

すなわち、本発明は、(1) IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤を提供する。

本発明はまた、(2) IL-6受容体に対する抗体を有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤を提供する。

本発明はまた、(3) IL-6受容体に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤を提供する。

本発明はまた、(4) ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤を提供する。ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体は、好ましくはPM-1抗体である。

本発明はまた、（５）マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤を提供する。マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体は、好ましくはMR16-1抗体である。

本発明はまた、（６）IL-6受容体に対する組換え型抗体を有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤を提供する。IL-6受容体に対する組換え型抗体は、好ましくはヒト抗体定常領域（C領域）を有する。

本発明はまた、（７）IL-6受容体に対するキメラ抗体又はヒト型化抗体を有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤を提供する。

本発明はまた、（８）ヒト型化PM-1抗体を有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤を提供する。

本発明はまた、（９）前記（１）～（８）に記載のIL-6アンタゴニストを有効成分として含有する急性膵炎又は慢性膵炎の予防又は治療剤を提供する。急性膵炎又は慢性膵炎は、例えば重症膵炎又は軽症膵炎である。

本発明はまた、（１０）前記（１）～（８）に記載のIL-6アンタゴニストを有効成分として含有する膵炎における膵臓浮腫抑制剤を提供する。

本発明はさらに、（１１）前記（３）～（８）に記載のIL-6受容体に対する抗体を有効成分として含有する膵炎における膵臓浮腫抑制剤を提供する。

図面の簡単な説明

図１は、IL-6トランスジェニックマウスが正常マウスに比べて、セルレイン投与により膵浮腫の結果膵臓重量が増すことを示す図で

ある。また、抗IL-6受容体抗体の投与によりそれが抑制されることを示す図である。

図2は、正常マウスにセルレインを投与して急性膵炎を発生させた膵臓の組織の顕微鏡写真であり、生物の形態を表わす図面代用写真である。

図3は、IL-6トランスジェニックマウスにセルレインを投与して急性膵炎を発生させた膵臓の組織の顕微鏡写真であり、生物の形態を表す図面代用写真である。

図4は、IL-6トランスジェニックマウスにセルレインを投与して急性膵炎を発生させると共にMR16-1を投与した場合の膵臓の組織の顕微鏡写真であり、生物の形態を表す図面代用写真である。図2における正常マウスでのセルレイン誘導膵炎に比べて、図3におけるIL-6トランスジェニックマウスでのセルレイン誘導膵炎が増悪しており（すなわち、間質の浮腫、炎症性細胞の浸潤の増加）、これに対して、図4においては抗IL-6受容体抗体MR16-1の投与により増悪が抑制されている。

図5は、LPS およびセルレイン投与により惹起されたIL-6トランスジェニックマウスにおける膵臓重量の増加が、抗IL-6受容体抗体の投与により抑制されることを示す図である。

発明の実施の形態

本発明で使用されるIL-6アンタゴニストは、膵炎の予防又は治療効果、又は膵炎における膵臓浮腫抑制効果を示すものであれば、その由来、種類および形状を問わない。

IL-6アンタゴニストは、IL-6によるシグナル伝達を遮断し、IL-6の生物学的活性を阻害する物質である。IL-6アンタゴニストは、好ましくはIL-6、IL-6受容体及びgp130 のいずれかの結合に対する阻

害作用を有する物質である。IL-6アンタゴニストとしては、例えば抗IL-6抗体、抗IL-6受容体抗体、抗gp130抗体、IL-6改変体、可溶性IL-6受容体改変体あるいはIL-6又はIL-6受容体の部分ペプチドおよび、これらと同様の活性を示す低分子物質が挙げられる。

本発明で使用する抗IL-6抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用する抗IL-6抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はIL-6と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

このような抗体としては、MH166 (Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956) やSK2 抗体 (Sato, K. et al., 第21回 日本免疫学会総会、学術記録(1991) 21, 166) 等が挙げられる。

抗IL-6抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、抗IL-6抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6は、Eur. J. Biochem (1987) 168, 543-550、J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541、あるいはAgr. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688 に開示

されたIL-6遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

IL-6の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のIL-6蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

本発明で使用される抗IL-6受容体抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗IL-6受容体抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はIL-6受容体と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

このような抗体としては、MR16-1抗体 (Tamura, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924-11928)、PM-1抗体 (Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906)、AUK12-20抗体、AUK64-7 抗体あるいはAUK146-15 抗体 (国際特許出願公開番号W0 92-19759)などが挙げられる。これらのうちで、特に好ましい抗体としてPM-1抗体が挙げられる。

なお、PM-1抗体産生ハイブリドーマ細胞株は、PM-1として、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1 丁目1 番3 号) に、平成2 年7 月10日に、FERM BP-2998としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。また、MR16-1 抗体産生ハイブリドーマ細胞株は、Rat-mouse hybridoma MR16-1として、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1 丁目1 番3 号) に、平成

9年3月13日に、FERM BP-5875としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

抗IL-6受容体モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6受容体を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、抗IL-6受容体抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6受容体は、欧州特許出願公開番号EP 325474 に、マウスIL-6受容体は日本特許出願公開番号特開平3-155795に開示されたIL-6受容体遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

IL-6受容体蛋白質は、細胞膜上に発現しているものと細胞膜より離脱しているもの（可溶性IL-6受容体）（Yasukawa, K. et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676）との二種類がある。可溶性IL-6受容体抗体は細胞膜に結合しているIL-6受容体の実質的に細胞外領域から構成されており、細胞膜貫通領域あるいは細胞膜貫通領域と細胞内領域が欠損している点で膜結合型IL-6受容体と異なっている。IL-6受容体蛋白質は、本発明で用いられる抗IL-6受容体抗体の作製の感作抗原として使用されうる限り、いずれのIL-6受容体を使用してもよい。

IL-6受容体の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のIL-6受容体蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6受容体蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6受容体を

発現している細胞やIL-6受容体蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

ヒトIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpIBIBSF2Rを含有する大腸菌(E. coli)は、平成元年(1989年)1月9日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に、HB101-pIBIBSF2Rとして、受託番号FERM BP-2232としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

本発明で使用される抗gp130抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗gp130抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はgp130と結合することにより、IL-6/IL-6受容体複合体のgp130への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

このような抗体としては、AM64抗体(特開平3-219894)、4B11抗体および2H4抗体(US 5571513) B-S12抗体およびB-P8抗体(特開平8-291199)などが挙げられる。

抗gp130モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、gp130を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナル抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるgp130は、

欧州特許出願公開番号EP 411946 に開示されたgp130 遺伝子／アミノ酸配列を用いることによって得られる。

gp130 の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のgp130 蛋白質を公知の方法で精製し、この精製gp130 受容体蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、gp130 を発現している細胞やgp130 蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3X63Ag8.653 (Kearney, J. F. et al. J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)

、P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133)等が適宜使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C.、Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウィルス (HVJ)等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS)等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37℃程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1000-6000程度のPEG溶液を通常、30-60 % (w/v)の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイ

ブリドーマ) が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT 培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。当該HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原蛋白質又は抗原発現細胞で感作し、感作B リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266 と融合させ、所望の抗原又は抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる (特公平1-59878 参照)。さらに、ヒト抗体遺伝子のレパトリーを有するトランスジェニック動物に抗原又は抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい (国際特許出願公開番号WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 94/25585、WO 96/34096、WO 96/33735 参照)。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用され

る。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

例えば、抗IL-6受容体抗体産生ハイブリドーマの作製は、特開平3-139293に開示された方法により行うことができる。工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成2年7月10日に、FERM BP-2998としてブタペスト条約に基づき国際寄託されたPM-1抗体産生ハイブリドーマをBALB/cマウスの腹腔内に注入して腹水を得、この腹水からPM-1抗体を精製する方法や、本ハイブリドーマを適当な培地、例えば、10%ウシ胎児血清、5% BM-Condimed H1（Boehringer Mannheim 製）含有RPMI1640培地、ハイブリドーマSFM培地（GIBCO-BRL 製）、PFHM-II培地（GIBCO-BRL 製）等で培養し、その培養上清からPM-1抗体を精製する方法で行うことができる。

本発明には、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Borrebaeck C. A. K. and Larrik J. W. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。

具体的には、目的とする抗体を産生する細胞、例えばハイブリドーマから、抗体の可変（V）領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299）、AGPC法（Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159）等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit（Pharmacia製）等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit（Pharmacia 製）を用いることによりmRNAを直接調製するこ

とができる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit 等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDER

RACE Kit (Clontech製) およびPCR を用いた5'-RACE 法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) を使用することができる。得られたPCR 産物から目的とするDNA 断片を精製し、ベクターDNA と連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNA の塩基配列を公知の方法、例えば、デオキシ法により確認する。

目的とする抗体のV領域をコードするDNA が得られれば、これを所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNA と連結し、これを発現ベクターへ組み込む。又は、抗体のV領域をコードするDNA を、抗体C領域のDNA を含む発現ベクターへ組み込んでもよい。

本発明で使用する抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ (Chimeric) 抗体、ヒト型化 (Humanized) 抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDN

A をヒト抗体C 領域をコードするDNA と連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 125023 、国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照）。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

例えば、キメラPM-1抗体のL 鎖およびH 鎖のV 領域をコードするDNA を含むプラスミドは、各々pPM-k3およびpPM-h1と命名され、このプラスミドを有する大腸菌は、National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limitedに、1991年2 月11日に、各々NCIMB 40366 及びNCIMB40362としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR ）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている（欧州特許出願公開番号EP 125023 、国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照）。

具体的には、マウス抗体のCDR とヒト抗体のフレームワーク領域（FR; framework region）を連結するように設計したDNA 配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR 法により合成する。得られたDNA をヒト抗体C 領域をコードするDNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400 、国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照）。

CDR を介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように

抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

キメラ抗体、ヒト型化抗体には、ヒト抗体C 領域が使用される。ヒト抗体C 領域としては、C γ が挙げられ、例えば、C γ 1、C γ 2、C γ 3 又は C γ 4 を使用することができる。また、抗体又はその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C 領域を修飾してもよい。

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC 領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC 領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明に使用される抗体として有用である。

本発明に使用されるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化PM-1抗体が挙げられる (国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照)。

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリA シグナルを機能的に結合させたDNA あるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV 40)等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1 α

(HEF1 α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Mulligan, R. C. et al., Nature (1979) 277, 108-114)、また、HEF1 α プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Mizushima, S. and Nagata, S. Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Ward, E. S. et al., Nature (1989) 341, 544-546; Ward, E. S. et al. FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Better, M. et al. Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383) を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド (refold) して使用する (例えば、W096/30394を参照)。

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌

キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、*in vitro*および*in vivo*の産生系がある。*in vitro*の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、又は真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Veroなど、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5などが知られている。植物細胞としては、ニコチアナ・タバクム (*Nicotiana tabacum*)由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えばアスペルギルス属 (*Aspergillus*) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などが知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を*in vitro*で培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、*in vivo*にて抗体を

産生してもよい。

一方、*in vivo* の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系などがある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシなどを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、昆虫としては、カイコを用いることができる。植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。

これらの動物又は植物に抗体遺伝子を導入し、動物又は植物の体内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。(Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウィルスのカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Maeda, S. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターを *Agrobacterium tumefaciens* のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば *Nicotiana tabacum* に感染させ、本タバコの葉より所望の抗

体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

上述のようにin vitro又はin vivo の産生系にて抗体を産生する場合、抗体重鎖 (H 鎖) 又は軽鎖 (L 鎖) をコードするDNA を別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいはH 鎖およびL 鎖をコードするDNA を単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい (国際特許出願公開番号 WO 94-11523 参照)。

本発明で使用される抗体は、本発明に好適に使用され得るかぎり、抗体の断片やその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv又はH 鎖とL 鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv (scFv) が挙げられる。

具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる (例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照)。

scFvは、抗体のH 鎖V 領域とL 鎖V 領域を連結することにより得られる。このscFvにおいて、H 鎖V 領域とL 鎖V 領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリリンカーを介して連結される (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1988) 85, 5879-5883)。

scFvにおけるH 鎖V 領域およびL 鎖V 領域は、上記抗体として

記載されたもののいずれの由来であってもよい。V 領域を連結するペプチドリinkerとしては、例えばアミノ酸12-19 残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

scFvをコードするDNA は、前記抗体のH 鎖又は、H 鎖V 領域をコードするDNA 、およびL 鎖又は、L 鎖V 領域をコードするDNA を鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA 部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR 法により増幅し、次いで、さらにペプチドリinker部分をコードするDNA およびその両端を各々H 鎖、L 鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

また、一旦scFvをコードするDNA が作製されれば、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、scFvを得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール（PEG）等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

前記のように産生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては

、例えば、プロテインA カラム、プロテインG カラムが挙げられる。プロテインA カラムに用いる担体として、例えば、Hyper D、POROS、Sepharose F.F.等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用する抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。これらのクロマトグラフィーはHPLC (High performance liquid chromatography) に適用し得る。また、逆相HPLC (reverse phase HPLC) を用いてもよい。

上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又はELISA 等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、PBS(-)で適当に希釈した後、280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.35 OD として算出する。また、ELISA による場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M重炭酸緩衝液 (pH9.6) で 1 μ g/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG (TAGO製) 100 μ l を96穴プレート (Nunc製) に加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベーションし、抗体を固相化する。ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用する抗体又は抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG (CAPPEL製) 100 μ l を添加し、室温にて1時間インキュベーションする。

洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100 μ l を加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 製) を用いて405nm での吸光度

を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

本発明で使用するIL-6改変体は、IL-6受容体との結合活性を有し、且つIL-6の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、IL-6改変体はIL-6受容体に対しIL-6と競合的に結合するが、IL-6の生物学的活性を伝達しないため、IL-6によるシグナル伝達を遮断する。

IL-6改変体は、IL-6のアミノ酸配列のアミノ酸残基を置換することにより変異を導入して作製される。IL-6改変体のもととなるIL-6はその由来を問わないが、抗原性等を考慮すれば、好ましくはヒトIL-6である。

具体的には、IL-6のアミノ酸配列を公知の分子モデリングプログラム、たとえば、WHATIF (Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56) を用いてその二次構造を予測し、さらに置換されるアミノ酸残基の全体に及ぼす影響を評価することにより行われる。適切な置換アミノ酸残基を決定した後、ヒトIL-6遺伝子をコードする塩基配列を含むベクターを鋳型として、通常行われるPCR法によりアミノ酸が置換されるように変異を導入することにより、IL-6改変体をコードする遺伝子が得られる。これを必要に応じて適当な発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、産生及び精製方法に準じてIL-6改変体を得ることができる。

IL-6改変体の具体例としては、Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93、及びSavino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367、WO 96-18648、WO96-17869に開示されている。

本発明で使用するIL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、各々IL-6受容体あるいはIL-6との結合活性を有し、且つIL-6の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドはIL-6受容体又はIL-6に結合し、これらを捕捉することによりIL-6のIL-6受容体への結合を特異的に阻害

する。その結果、IL-6の生物学的活性を伝達しないため、IL-6によるシグナル伝達を遮断する。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、IL-6又はIL-6受容体のアミノ酸配列においてIL-6とIL-6受容体との結合に係わる領域の一部又は全部のアミノ酸配列からなるペプチドである。このようなペプチドは、通常10～80、好ましくは20～50、より好ましくは20～40個のアミノ酸残基からなる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、IL-6又はIL-6受容体のアミノ酸配列において、IL-6とIL-6受容体との結合に係わる領域を特定し、その一部又は全部のアミノ酸配列を通常知られる方法、例えば遺伝子工学的手法又はペプチド合成法により作製することができる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドを遺伝子工学的手法により作製するには、所望のペプチドをコードするDNA配列を発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、産生及び精製方法に準じて得ることができる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドをペプチド合成法により作製するには、ペプチド合成において通常用いられている方法、例えば固相合成法又は液相合成法を用いることができる。

具体的には、続医薬品の開発第14巻ペプチド合成 監修矢島治明廣川書店1991年に記載の方法に準じて行えばよい。固相合成法としては、例えば有機溶媒に不溶性である支持体に合成しようとするペプチドのC末端に対応するアミノ酸を結合させ、 α -アミノ基及び側鎖官能基を適切な保護基で保護したアミノ酸をC末端からN末端方向の順番に1アミノ酸ずつ縮合させる反応と樹脂上に結合したアミノ酸又はペプチドの α -アミノ基の該保護基を脱離させる反応を交互に繰り返すことにより、ペプチド鎖を伸長させる方法が用い

られる。固相ペプチド合成法は、用いられる保護基の種類により Boc 法と Fmoc 法に大別される。

このようにして目的とするペプチドを合成した後、脱保護反応及びペプチド鎖の支持体からの切断反応をする。ペプチド鎖との切断反応には、Boc 法ではフッ化水素又はトリフルオロメタンスルホン酸を、又 Fmoc 法では TFA を通常用いることができる。Boc 法では、例えばフッ化水素中で上記保護ペプチド樹脂をアニソール存在下で処理する。次いで、保護基の脱離と支持体からの切断をしペプチドを回収する。これを凍結乾燥することにより、粗ペプチドが得られる。一方、Fmoc 法では、例えば TFA 中で上記と同様の操作で脱保護反応及びペプチド鎖の支持体からの切断反応を行うことができる。

得られた粗ペプチドは、HPLC に適用することにより分離、精製することができる。その溶出にあたり、蛋白質の精製に通常用いられる水-アセトニトリル系溶媒を使用して最適条件下で行えばよい。得られたクロマトグラフィーのプロファイルのピークに該当する画分を分取し、これを凍結乾燥する。このようにして精製したペプチド画分について、マススペクトル分析による分子量解析、アミノ酸組成分析、又はアミノ酸配列解析等により同定する。

IL-6 部分ペプチド及び IL-6 受容体部分ペプチドの具体例は、特開平 2-188600、特開平 7-324097、特開平 8-311098 及び米国特許公報 US 5210075 に開示されている。

本発明で使用する IL-6 アンタゴニストの IL-6 シグナル伝達阻害活性は、通常用いられる方法により評価することができる。具体的には、IL-6 依存性細胞 MH60.BSF2 を培養し、これに IL-6 を添加し、同時に IL-6 アンタゴニストを共存させることにより IL-6 依存性細胞の ^3H -チミジン取込みを測定すればよい。また、IL-6 受容体発現細胞である U266 を培養し、 ^{125}I 標識 IL-6 を添加し、同時に IL-6 アン

タゴニストを加えることにより、IL-6受容体発現細胞に結合した¹²⁵I 標識 IL-6を測定する。上記アッセイ系において、IL-6アンタゴニストを存在させる群に加えIL-6アンタゴニストを含まない陰性コントロール群をおき、両者で得られた結果を比較すればIL-6アンタゴニストのIL-6阻害活性を評価することができる。

本発明の効果を確認するには、膵炎誘発剤、例えばセルレインを過剰投与して膵炎を発症した動物に本発明で使用されるIL-6アンタゴニストを投与し、膵臓の浮腫抑制効果や膵臓の重量改善を評価することにより行うことができる。また、本発明の他の効果として、膵炎の予防効果又は膵炎の再発防止効果がある。

膵炎を誘導するためにセルレインを動物に投与する方法は、例えば後述の実施例に記載の方法に従えばよい。また、膵炎を誘導する動物としては、通常実験に用いられる動物でよく、例えばマウス、ラットなどを用いることができる。

後述の実施例に示されるように、抗IL-6受容体抗体の投与により、膵炎を発症した実験動物において、膵臓重量の抑制及び膵臓の浮腫の改善が認められたことから、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストは膵炎治療効果を有することが示された。

本発明における治療対象は哺乳動物である。治療対象の哺乳動物は、好ましくはヒトである。

本発明の予防又は治療剤は、経口的にまたは非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、坐薬、注腸、経口性腸溶剤などを選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1 kgあたり0.01 mg から100 mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1~1000 mg、好ましくは5~50 mgの投与量を選ぶことができる。

。

本発明の予防又は治療剤は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

実施例

以下、実施例、参考例および実験例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1.

B6-hIL-6トランスジェニックマウス又はB6マウス（hIL-6 トランスジェニックマウスの同腹子）（Clinical Immunology and Immunopathology, vol. 82, 117-124, 1997）にセルレイン（caerulein、協和発酵製）を生理食塩水に溶解し、50 μ g/kgを1時間おきに7回、マウスに腹腔内投与した。このとき、抗マウスIL-6受容体モノクローナル抗体MR16-1は、最初のセルレイン投与の直前に、1 mg/mouseをマウス尾静脈より投与した。

コントロールには抗体の溶媒（PBS）を用いた。8時間後に、マウスを安楽死後、脾重量、血清中アミラーゼ、及び脾臓組織像を観察した。脾重量／体重を図1に示す。脾臓組織像を図2～4に示す。尚、血清アミラーゼヨードデンプン（ブルースターチ）法を用いて測定した。脾臓組織像はパラフィンブロックを作成後、ヘマトキシリンエオジン（HE）にて染色後、顕微鏡下にて観察した。

IL-6トランスジェニックマウスはその同腹子（正常マウス）に比して、セルレイン投与により誘導される脾臓重量がさらに上昇していた。

また、肉眼的な観察でも、浮腫が進行しており脾炎が進行していた。IL-6トランスジェニックマウスにMR16-1を投与することにより、そのセルレイン投与で誘導される脾重量の上昇が抑制された。組織学的に、IL-6トランスジェニックマウス群（図3）と正常マウス群（図2）を比較すると、正常マウスの方が浮腫などの面積が狭く、好中球の浸潤等により侵されている領域が狭かった。これは、MR16-1を投与することにより、改善が見られた（図4）。したがって、セルレイン誘導急性脾炎マウスモデルにおいて、抗IL-6受容体モノクローナル抗体の効果が認められたことにより、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストは、IL-6の作用を抑制することで、急性脾炎の治療、重症度の軽減及び発症予防に有用である。

実施例 2.

B6-hIL-6トランスジェニックマウス又はB6マウス（hIL-6 トランスジェニックマウスの同腹子）（Clinical Immunology and Immunopathology, vol.82, 117-124, 1997）に、生理食塩水に溶解したセルレイン（caerulein、協和発酵製）50 μ g/kgを1時間おきに7回、マウスに腹腔内投与した。また、重症脾炎を惹起するため、最初のセルレイン投与と同時にLPS（lipopolysaccharide, Sigma社製）

1 mg/kgを腹腔内投与した。抗マウスIL-6受容体モノクローナル抗体MR16-1は、最初のセルレイン投与の10分前に、1 mg/mouseをマウス尾静脈より投与した。コントロールには抗体の溶媒（PBS）を用いた。8時間後に、マウスを安楽死後、脾重量の測定をおこなった。脾重量／体重を図5に示す。

IL-6トランスジェニックマウスに重症脾炎を惹起した場合、MR16-1を投与することにより、著しい改善効果が見られた。したがって、セルレインとLPSにより誘導される重症急性脾炎マウスモデルにおいて、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストは、IL-6の作用を抑制することで、重症急性脾炎の治療、重症度の軽減および発症予防に有用である。

参考例 1. ヒト可溶性IL-6受容体の調製

Yamasakiらの方法（Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828）に従い得られたIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpBSF2R.236を用いて、PCR法により可溶性IL-6受容体を作成した。プラスミドpBSF2R.236を制限酵素Sph Iで消化して、IL-6受容体cDNAを得、これをmp18（Amersham製）に挿入した。IL-6受容体cDNAにストップコドンを導入するようにデザインした合成オリゴプライマーを用いて、インビトロミュータジェネシスシステム（Amersham製）により、PCR法でIL-6受容体cDNAに変異を導入した。この操作によりストップコドンがアミノ酸345の位置に導入され、可溶性IL-6受容体をコードするcDNAが得られた。

可溶性IL-6受容体cDNAをCHO細胞で発現するために、プラスミドpSV（Pharmacia製）と連結させ、プラスミドpSVL344を得た。dhfrのcDNAを含むプラスミドpECEdhfrにHind III-Sal Iで切断した可溶性IL-6受容体cDNAを挿入し、CHO細胞発現プラスミドpECEdhfr344を得た。

10 μ g のプラスミド pECEdhfr344 を dhfr-CHO 細胞株 DXB-11 (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) へカルシウムフォスフェイト沈降法 (Chen, C. et al., Mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745-2751) により、トランスフェクトした。トランスフェクトした CHO 細胞を 1mM グルタミン、10% 透析 FCS、100U/ml のペニシリンおよび 100 μ /ml のストレプトマイシンを含むヌクレオシド不含 α MEM 選択培養液で 3 週間培養した。

選択された CHO 細胞を限界希釈法でスクリーニングし、単一の CHO 細胞クローンを得た。この CHO 細胞クローンを 20nM~200nM の濃度のメトトレキサートで増幅し、ヒト可溶性 IL-6 受容体産生 CHO 細胞株 5E27 を得た。CHO 細胞株 5E27 を 5% FBS を含むイスコーブ改変ダルベコ培養液 (IMDM、Gibco 製) で培養した。培養上清を回収し、培養上清中の可溶性 IL-6 受容体の濃度を ELISA にて測定した。その結果、培養上清中には可溶性 IL-6 受容体が存在することが確認された。

参考例 2. 抗ヒト IL-6 抗体の調製

10 μ g の組換え型 IL-6 (Hirano, T. et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41) をフロイント完全アジュバントとともに BALB/c マウスを免疫し、血清中に抗 IL-6 抗体が検出できるまで一週間毎にこれを行った。局所のリンパ節から免疫細胞を摘出し、ポリエチレングリコール 1500 を用いてミエローマ細胞株 P3U1 と融合させた。ハイブリドーマを HAT 培養液を用いる Oi の方法 (Selective Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) に従って選択し、抗ヒト IL-6 抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。

抗ヒト IL-6 抗体を産生するハイブリドーマは下記のようにして IL-6 結合アッセイをおこなった。すなわち、柔軟なポリビニル製の 96

穴マイクロプレート (Dynatech Laboratories, Inc. 製, Alexandria, VA) を0.1Mのcarbonate-hydrogen carbonate緩衝液 (pH 9.6) 中で 100 μ l のヤギ抗マウスIg (10 μ l/ml, Cooper Biomedical, Inc製 Malvern, PA) により4 $^{\circ}$ Cで一晩コートした。次いで、プレートを 100 μ l の1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBS により室温で2 時間処理した。

これをPBS で洗浄した後、100 μ l のハイブリドーマ培養上清を各穴へ加え、4 $^{\circ}$ Cにて一晩インキュベートした。プレートを洗浄して、2000cpm/0.5ng/wellとなるように 125 I 標識組換え型IL-6を各穴へ添加し、洗浄した後各穴の放射活性をガンマカウンター (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA) で測定した。216 ハイブリドーマクロンのうち32のハイブリドーマクロンがIL-6結合アッセイにより陽性であった。これらのクロンのなかで最終的に安定なMH166.BSF2が得られた。該ハイブリドーマが産生する抗IL-6抗体MH166 はIgG1 κ 型のサブタイプを有する。

ついで、IL-6依存性マウスハイブリドーマクロンMH60.BSF2 を用いてMH166 抗体によるハイブリドーマの増殖に関する中和活性を調べた。MH60.BSF2 細胞を1 $\times 10^4$ /200 μ l/穴となるように分注し、これにMH166 抗体を含むサンプルを加え、48時間培養し、0.5 μ Ci/穴の 3 H チミジン (New England Nuclear, Boston, MA) を加えた後、更に6 時間培養を続けた。細胞をグラスフィルターペーパー上におき、自動ハーベスター (Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan) で処理した。コントロールとしてウサギ抗IL-6抗体を用いた。

その結果、MH166 抗体はIL-6により誘導されるMH60.BSF2 細胞の 3 H チミジンの取込みを容量依存的に阻害した。このことより、MH166 抗体はIL-6の活性を中和することが明らかとなった。

参考例 3. 抗ヒトIL-6受容体抗体の調製

Hirataらの方法 (Hirata, Y. et al. J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906) により作成した抗IL-6受容体抗体MT18をCNBrにより活性化させたセファロース4B (Pharmacia Fine Chemicals製, Piscataway, NJ) と添付の処方にしたがって結合させ、IL-6受容体 (Yamashiki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828) を精製した。ヒトミエローマ細胞株U266を1%ジギトニン (Wako Chemicals製), 10 mM トリエタノールアミン (pH 7.8) および0.15M NaClを含む1mM p-パラアミノフェニルメタンスルフォニルフルオリドハイドロクロリド (Wako Chemicals製) (ジギトニン緩衝液) で可溶化し、セファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合した。その後、ビーズをジギトニン緩衝液で6回洗浄し、免疫するための部分精製IL-6受容体とした。

BALB/cマウスを 3×10^8 個のU266細胞から得た上記部分精製IL-6受容体で10日おきに4回免疫し、その後常法によりハイブリドーマを作成した。成長陽性穴からのハイブリドーマ培養上清を下記の方法にてIL-6受容体への結合活性を調べた。 5×10^7 個のU266細胞を ^{35}S -メチオニン (2.5mCi) で標識し、上記ジギトニン緩衝液で可溶化した。可溶化したU266細胞を0.04ml容量のセファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合し、その後、ジギトニン緩衝液で6回洗浄し、0.25mlのジギトニン緩衝液 (pH3.4) により ^{35}S -メチオニン標識IL-6受容体を流出させ、0.025mlの1M Tris (pH 7.4) で中和した。

0.05mlのハイブリドーマ培養上清を0.01mlのProtein G セファロース (Pharmacia 製) と混合した。洗浄した後、セファロースを上記で調製した0.005mlの ^{35}S 標識IL-6受容体溶液とともにインキュベートした。免疫沈降物質をSDS-PAGEで分析し、IL-6受容体と反応

するハイブリドーマ培養上清を調べた。その結果、反応陽性ハイブリドーマクローンPM-1を樹立した。ハイブリドーマPM-1から産生される抗体は、IgG1 κ 型のサブタイプを有する。

ハイブリドーマPM-1が産生する抗体のヒトIL-6受容体に対するIL-6の結合阻害活性をヒトミエローマ細胞株U266を用いて調べた。ヒト組換え型IL-6を大腸菌より調製し（Hirano, T. et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41-45）、ボルトン-ハンター試薬（New England Nuclear, Boston, MA）により¹²⁵I標識した（Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981）。 4×10^5 個のU266細胞を1時間、70%（v/v）のハイブリドーマPM-1の培養上清および14000cpmの¹²⁵I標識IL-6とともに培養した。70 μ lのサンプルを400 μ lのマイクロフュージポリエチレンチューブに300 μ lのFCS上に重層し、遠心の後、細胞上の放射活性を測定した。

その結果、ハイブリドーマPM-1が産生する抗体は、IL-6のIL-6受容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

参考例 4. 抗マウスIL-6受容体抗体の調製

Saito, T. et al., J. Immunol. (1991) 147, 168-173 に記載の方法により、マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を調製した。

マウス可溶性IL-6受容体を産生するCHO細胞を10%FCSを含むIMDM培養液で培養し、その培養上清から抗マウスIL-6受容体抗体RS12（上記Saito, T. et al 参照）をAffigel 10ゲル（Biorad製）に固定したアフィニティーカラムを用いてマウス可溶性IL-6受容体を精製した。

得られたマウス可溶性IL-6受容体50 μ gをフロイント完全アジュバンドと混合し、ウィスターラットの腹部に注射した。2週間後からはフロイント不完全アジュバンドで追加免疫した。45日目にラッ

ト脾臓細胞を採取し、 2×10^8 個を 1×10^7 個のマウスミエローマ細胞P3U1と50%のPEG1500 (Boehringer Mannheim 製) をもちいて常法により細胞融合させた後、HAT 培地にてハイブリドーマをスクリーニングした。

ウサギ抗ラットIgG 抗体 (Cappel製) をコートしたプレートにハイブリドーマ培養上清を加えた後、マウス可溶性IL-6受容体を反応させた。次いで、ウサギ抗マウスIL-6受容体抗体およびアルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗ウサギIgG によるELISA 法によりマウス可溶性IL-6受容体に対する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。抗体の産生が確認されたハイブリドーマクローンは2 回のサブスクリーニングを行い、単一のハイブリドーマクローンを得た。このクローンをMR16-1と名付けた。

このハイブリドーマが産生する抗体のマウスIL-6の情報伝達における中和活性をMH60.BSF2 細胞 (Matsuda, T. et al., J. Immunol. (1988) 18, 951-956) を用いた ^3H チミジンの取込みで調べた。96ウェルプレートにMH60.BSF2 細胞を 1×10^4 個/200 μl /ウェルとなるように調製した。このプレートに10pg/ml のマウスIL-6とMR16-1抗体又はRS12抗体を12.3~1000ng/ml 加えて37°C、5%CO₂ で44時間培養した後、1 μCi /ウェルの ^3H チミジンを加えた。4 時間後に ^3H チミジンの取込みを測定した。その結果MR16-1抗体はMH60.BSF2 細胞の ^3H チミジン取込みを抑制した。

したがって、ハイブリドーマMR16-1が産生する抗体は、IL-6のIL-6受容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

産業上の利用可能性

本発明により、抗IL-6受容体抗体等のIL-6アンタゴニストが肺炎の治療効果を有することが示された。したがって、IL-6アンタゴニ

ストは急性腭炎等の治療剤として有用であることが明らかにされた。
。

請 求 の 範 囲

1. インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを有効成分として含有する膵炎の予防又は治療剤。

2. IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体であることを特徴とする請求項1記載の予防又は治療剤。

3. IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項2に記載の予防又は治療剤。

4. IL-6受容体に対する抗体がヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項3に記載の予防又は治療剤。

5. IL-6受容体に対する抗体がマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項3に記載の予防又は治療剤。

6. IL-6受容体に対する抗体が組換え型抗体であることを特徴とする請求項2～5のいずれか1項に記載の予防又は治療剤。

7. ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がPM-1抗体であることを特徴とする請求項4に記載の予防又は治療剤。

8. マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がMR16-1抗体であることを特徴とする請求項5に記載の予防又は治療剤。

9. IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するキメラ抗体又はヒト型化抗体であることを特徴とする請求項2～4のいずれか1項に記載の予防又は治療剤。

10. IL-6受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化PM-1抗体であることを特徴とする請求項9に記載の予防又は治療剤。

11. 膵炎が、急性膵炎である、請求項1～10のいずれか1項に記載の予防又は治療剤。

12. IL-6アンタゴニストを有効成分として含有する腓炎における腓臓浮腫抑制剤。

13. IL-6受容体に対する抗体を有効成分として含有する腓炎における腓臓浮腫抑制剤。

14. 腓炎の予防又は治療のための方法であって、腓炎の予防又は治療のために有効な量のインターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストを予防又は治療を必要とする患者に投与することを含んで成る方法。

15. IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体であることを特徴とする請求項14記載の予防又は治療方法。

16. IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項15に記載の予防又は治療方法。

17. IL-6受容体に対する抗体がヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項16に記載の予防又は治療方法。

18. IL-6受容体に対する抗体がマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項16に記載の予防又は治療方法。

19. IL-6受容体に対する抗体が組換え型抗体であることを特徴とする請求項15に記載の予防又は治療方法。

20. ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がPM-1抗体であることを特徴とする請求項17に記載の予防又は治療方法。

21. マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がMR16-1抗体であることを特徴とする請求項18に記載の予防又は治療方法。

22. IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するキメラ抗体又はヒト型化抗体であることを特徴とする請求項15に記載の予防

又は治療方法。

23. IL-6受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化PM-1抗体であることを特徴とする請求項22に記載の予防又は治療方法。

24. 脾炎が、急性脾炎である、請求項14に記載の予防又は治療方法。

25. 脾炎における脾臓浮腫の抑制方法において、脾臓浮腫の抑制のために有効な量のIL-6アンタゴニストを、脾臓浮腫の抑制を必要とする患者に投与することを含んで成る方法。

26. 脾炎における脾臓浮腫の抑制方法において、脾臓浮腫の抑制のために有効な量のIL-6受容体に対する抗体を、脾臓浮腫の抑制を必要とする患者に投与することを含んで成る方法。

27. 脾炎の予防又は治療剤の製造のためのインターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニストの使用。

28. IL-6アンタゴニストがIL-6受容体に対する抗体であることを特徴とする請求項27記載の使用。

29. IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項28に記載の使用。

30. IL-6受容体に対する抗体がヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項29に記載の使用。

31. IL-6受容体に対する抗体がマウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項29に記載の使用。

32. IL-6受容体に対する抗体が組換え型抗体であることを特徴とする請求項28～31のいずれか1項に記載の使用。

33. ヒトIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がPM-1抗体であることを特徴とする請求項30に記載の使用。

34. マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体がMR16-1抗体であることを特徴とする請求項31に記載の使用。

35. IL-6受容体に対する抗体がIL-6受容体に対するキメラ抗体又はヒト型化抗体であることを特徴とする請求項28～30のいずれか1項に記載の使用。

36. IL-6受容体に対するヒト型化抗体がヒト型化PM-1抗体であることを特徴とする請求項35に記載の使用。

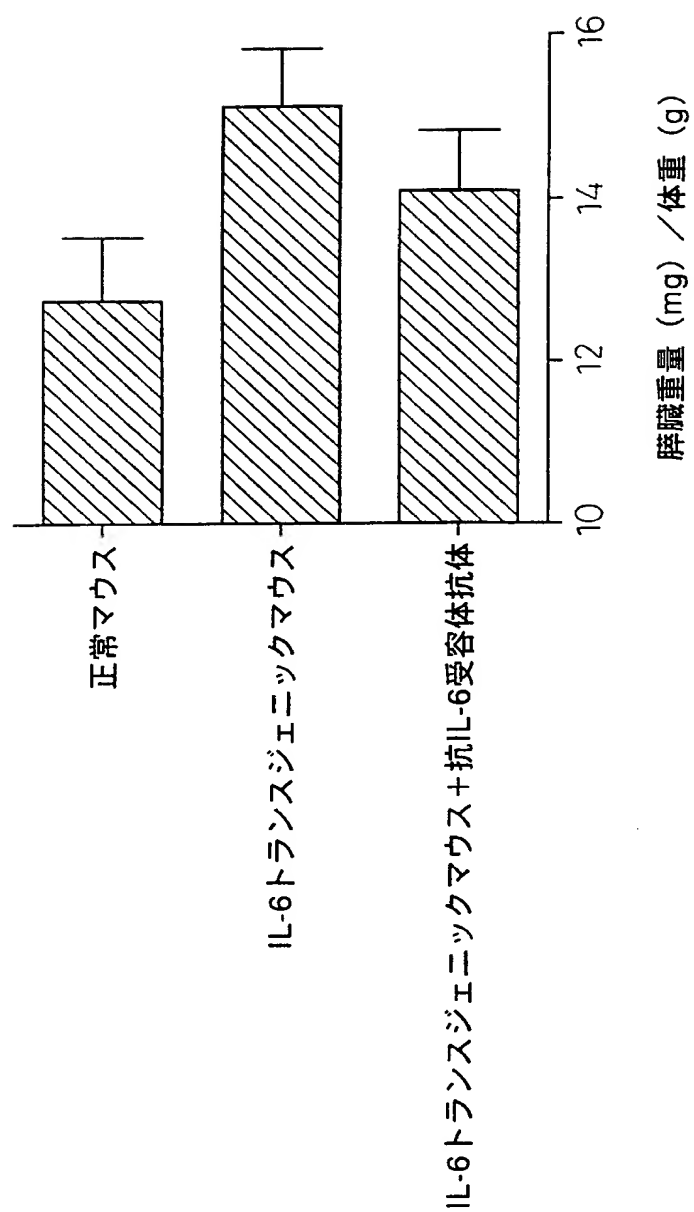
37. 膵炎が、急性膵炎である、請求項27～36のいずれか1項に記載の使用。

38. 膵炎における膵臓浮腫の抑制剤の製造のためのIL-6アンタゴニスト使用。

39. 膵炎における膵臓浮腫の抑制剤の製造のためのIL-6受容体に対する抗体の使用。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 2

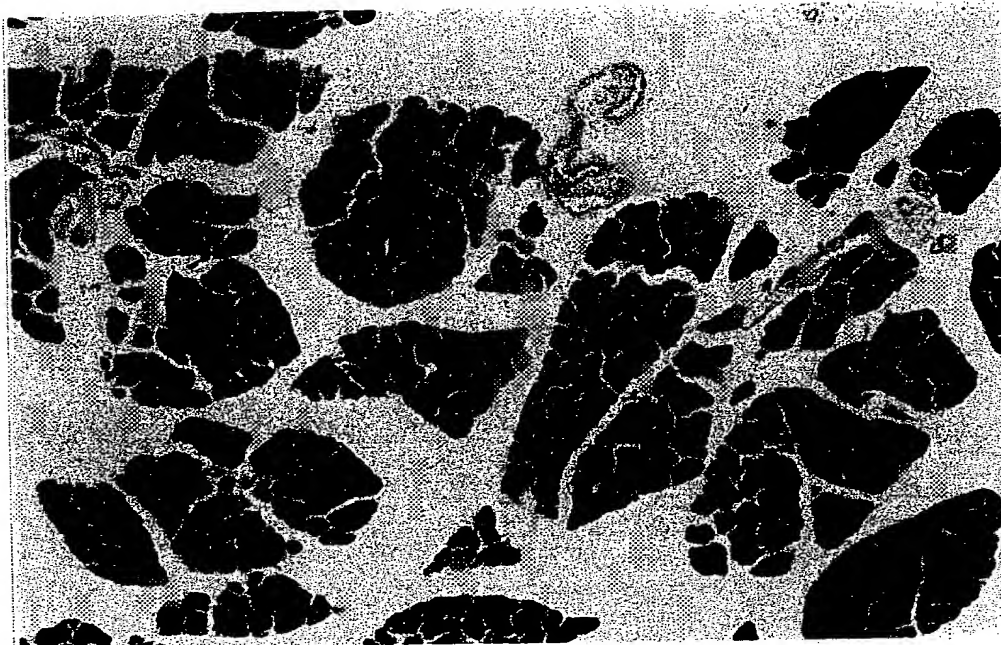
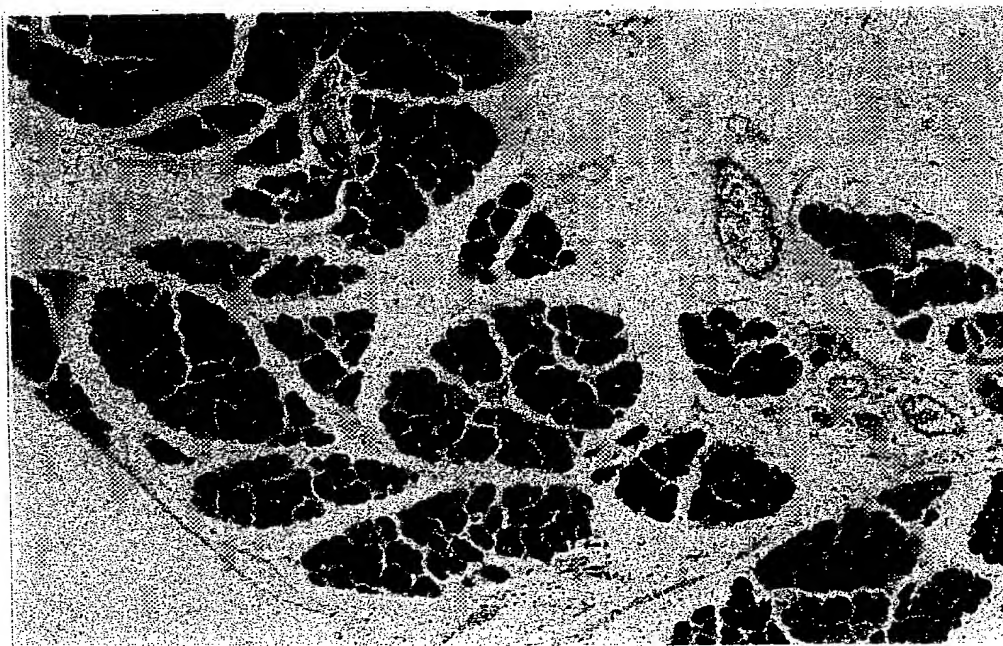
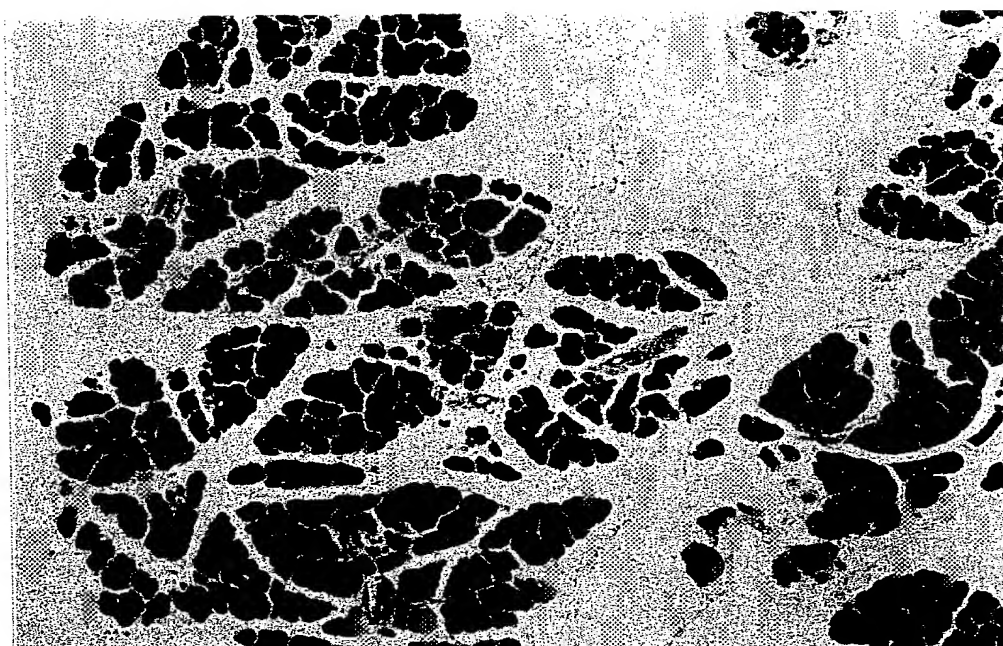


Fig. 3



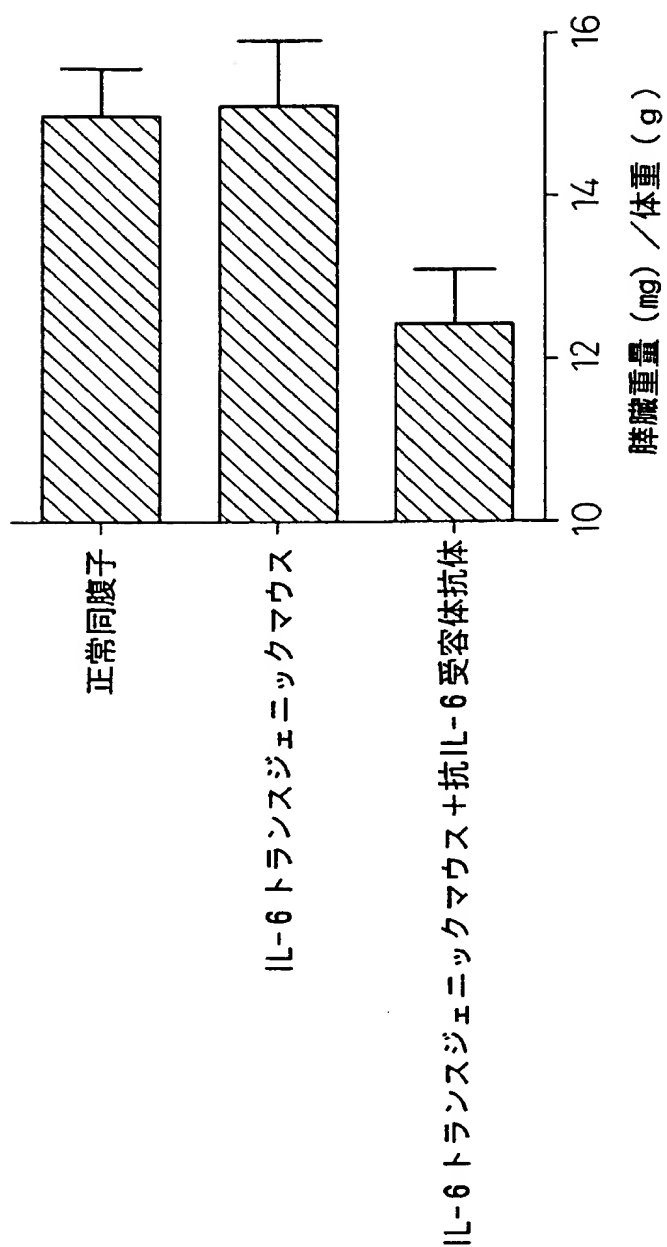
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04533

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ A61K45/00, A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ A61K45/00, A61K39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------------------|
| X Y | Chemical Abstracts, Vol. 121, Abstract 154705 (1994), "Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet-specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice" | 1, 27 2-13, 28-39 |
| X Y | H.Hank Simms et al, "Polymorphonuclear Leukocyte Dysregulation During the Systemic Inflammatory Response Syndrome", Blood, Vol. 83, No.5 (1994) P.1398-1407 | 1, 27 2-13, 28-39 |
| Y | EP, 572118, A1 (TOSOH CORP.) 01 December, 1993 (01.12.93), & JP, 5-304986, A & US, 5866689, A & DE, 69319662, E & IL, 105541, A | 1-4, 6, 10-13 27-30, 32, 36-39 |
| Y | WO, 92/19759, A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA), 12 November, 1992 (12.11.92), & EP, 628639, A1 & DE, 69229482, E & US, 5795965, A & JP, 5-227970, A | 1-13, 27-39 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 November, 1999 (16.11.99)

Date of mailing of the international search report
30 November, 1999 (30.11.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04533

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | Fumimaro Takaku et al. "The Merck Manual 16 th Ed." (Publication on 01 May, 1995 3 rd printing) P.760-766, Column " Pancreatitis" | 12,13,38,39 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04533

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14-26
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claims 14-26 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international search report by this International Search Authority in accordance with PCT Article 17(2) (a)(i) and Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ A61K45/00、A61K39/395

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ A61K45/00、A61K39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)、REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|----------------------|
| X Y | Chemical Abstracts, Vol. 121, Abstract 番号 154705 (1994), "Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet-specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice" | 1, 27 2-13, 28-39 |
| X Y | H. Hank Simms et al., "Polymorphonuclear Leukocyte Dysregulation During the Systemic Inflammatory Response Syndrome", Blood, | 1, 27 2-13, 28-39 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 11. 99

国際調査報告の発送日

30.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

印

4C 9051

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|---------------------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| | Vol. 83, No. 5 (1994) P. 1398-1407 | |
| Y | EP, 572118, A1 (TOSOH CORP.) 1. 12 月. 1993 (01. 12. 93) & JP, 5-30498 6, A & US, 5866689, A & DE, 693196 62, E & IL, 105541, A | 1-4, 6, 10-13 27-30, 32, 36- 39 |
| Y | WO, 92/19759, A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 12. 11月. 1992 (1 2. 11. 92) & EP, 628639, A1 & DE, 6 9229482, E & US, 5795965, A & JP, 5-227970, A | 1-13, 27-39 |
| Y | 高久 史麿 外「メルク マニュアル 第16版」(1995年5 月1日第3刷発行) P. 760-766、「腓炎」の項 | 12, 13, 38, 39 |

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 14-26 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲14~26は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第17条(2)(a)(i) 及びPCT規則39.1(iV) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

THIS PAGE BLANK (USPTO)